

**PROTEÍNAS DE UNIÓN A PD-1 Y TIGIT BIESPECÍFICAS Y USOS DE
ESTAS**

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 63/182.156, presentada el 30 de abril de 2021, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia.

10

**INCORPORACIÓN POR REFERENCIA DEL MATERIAL PRESENTADO
ELECTRÓNICAMENTE**

Se incorpora por referencia en su totalidad en la presente descripción un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible por computador presentado de manera concurrente con la presente descripción e identificado de la siguiente manera: Un archivo de ASCII (texto) de 28.168 bytes denominado “TIGIT-101-WO-
PCT_SL_ST25.TXT,” creado el 26 de abril de 2022.

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

La descripción se relaciona con proteínas de unión, que incluyen anticuerpos, que se unen específicamente a muerte programada (“PD-1”) y a

inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM (“TIGIT”). La descripción también proporciona composiciones que comprenden tales proteínas de unión y moléculas de ácido nucleico que codifican tales proteínas de unión. La descripción también se relaciona con métodos para tratar un trastorno o afección usando tales proteínas de unión.

ANTECEDENTES

10

Muerte programada 1 (“PD-1”) es una proteína de membrana tipo I de aproximadamente 31 kD que es miembro de la familia CD28/CTLA4 extendida de los reguladores de células T (ver Iscida *et al.*, “Induced Expression of PD-1, A Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death”, *EMBO J.* 11: 3887-95 (1992)). PD-1 se expresa en células T, células B y monocitos activados y en niveles bajos en células T destructoras naturales (NK). PD-1 es una diana bien validada para la terapia mediada por el sistema inmunitario en oncología. La inhibición antagonista de la interacción PD-1/PD-L1 aumenta la activación de las células T, lo que mejora el reconocimiento y la eliminación de las células tumorales por el sistema inmunitario del huésped.

25 TIGIT (también conocido como inmunorreceptor de células T con dominios Ig e ITIM) es un receptor

inmunitario presente en algunas células T y células destructoras naturales (NK). El TIGIT está regulado positivamente por células inmunitarias, incluidos las células T activadas, las células destructoras naturales y
5 las células T reguladoras.

SUMARIO

En la presente descripción se proporciona una
10 proteína de unión biespecífica que se une específicamente a PD-1 y TIGIT que comprende: a) un primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1, en donde el primer dominio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 que tiene la
15 secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1, una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2 y una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una LCDR1
20 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4, una LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5 y una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6; y b) un segundo dominio de unión que se une
25 específicamente a TIGIT, en donde el segundo dominio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada que

comprende una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12 y una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14, una LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15, y una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

También se proporciona en la presente descripción un método para tratar a un sujeto que tiene un tumor que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de las proteínas de unión biespecíficas descritas en la presente descripción. También se proporciona en la presente descripción un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que comprende administrar las proteínas de unión biespecíficas descritas en la presente descripción.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra un análisis de secuencia de los residuos identificados en la cadena pesada variable de VAR1 parental.

La Figura 2 muestra un análisis de secuencia de los residuos identificados en la cadena ligera variable de VAR1 parental.

Las Figuras 3A y 3B muestran la alineación de la
5 cadena pesada variable del VAR1 parental con la secuencia de la línea germinal. Las CDR en la Figura 3A están resaltadas de acuerdo con el sistema de numeración de Chothia. Las CDR en la Figura 3B están resaltadas de acuerdo con el sistema de numeración de IMGT. La
10 alineación ilustra que el VAR1 parental tenía cuatro aminoácidos en FR1 que no eran de línea germinal y que no eran residuos Vernier.

Las Figuras 4A y 4B muestran la alineación de la cadena ligera variable del VAR1 parental con la secuencia
15 de la línea germinal. La alineación ilustra que la VL del VAR1 parental tenía diez aminoácidos que no eran de línea germinal, un residuo Vernier Q (Q-K) en FR3, un residuo de empaque de cadena F (F-Y) antes de CDRL3, y un residuo de empaque de cadena L (L-F) después de CDRL3.

20 La Figura 5 muestra que las variantes de VAR1 mantuvieron propiedades de apareamiento y expresión eficientes.

Las Figuras 6A y 6B muestran que las variantes de VAR1 retuvieron las propiedades de unión celular de los mAb
25 parentales a OE 293 de TIGIT humano y de cynomolgus. Los

datos se presentan como la mediana de intensidad de fluorescencia (MFI).

La Figura 7 muestra las características y el formato de aspectos particulares de las proteínas de unión
5 descritas en la presente descripción.

Figuras 8A-8B. La Figura 8A muestra la unión simultánea usando el formato de captura de antígeno. Los sensores cargados con el antígeno TIGIT humano se expusieron a interacciones de asociación y disociación
10 sucesivas primero con AZD2936 después con PD-1 humano. Aso: asociación; Diso: disociación; SA: estreptavidina. La Figura 8B muestra la unión simultánea usando el formato de captura de antígeno. Los sensores cargados con el antígeno PD-1 humano se expusieron a interacciones de
15 asociación y disociación sucesivas primero con AZD2936, después con TIGIT humano. Aso: asociación; Diso: disociación; Ni-NTA: níquel-ácido nitrilotriacético.

Las Figuras 9A-9C muestran que AZD2936 demostró actividad de unión a PD-1 y TIGIT en comparación con
20 anticuerpos monoespecíficos. La Figura 9A muestra la unión celular de AZD2936 a receptores de TIGIT humano en células de PD-1⁻TIGIT⁺ Jurkat modificadas genéticamente. La Figura 9B muestra la unión celular de AZD2936 a receptores de PD-1 humano en células de PD-1⁺ TIGIT⁻ Jurkat modificadas
25 genéticamente. La Figura 9C muestra la unión celular de AZD2936 a receptores de PD-1 y TIGIT humanos en PD-1⁻TIGIT⁺

Jurkat, PD-1⁺TIGIT⁻ Jurkat, o doble expresión de PD-1⁺TIGIT⁺ Jurkat. MFI = intensidad de fluorescencia media geométrica; PD-1 = proteína de muerte celular programada 1; TIGIT = inmunorreceptor de células T con Ig y dominios de motivos
5 inhibidores basados en tirosina inmunorreceptores. Unión celular a líneas celulares de expresión única humana: PD-1⁻TIGIT⁺ Jurkat y PD-1⁺TIGIT⁻ Jurkat o PD-1⁺TIGIT⁻ Jurkat de doble expresión humana. Los anticuerpos de artículo de control y de prueba se detectaron con anticuerpo secundario
10 IgG antihumano de cabra conjugado con fluorescencia y se evaluaron mediante citometría de flujo.

Las Figuras 10A-10C muestran que AZD2936 demostró actividad de bloqueo de ligandos de PD-1 y TIGIT para mejorar la señalización mediada por TCR usando el ensayo
15 reportero Jurkat en comparación con anticuerpos monoespecíficos. La Figura 10A muestra la bioactividad de AZD2936 y anticuerpo Anti-PD-1 en ensayos de cocultivo de dos células reporteras de NFAT-Luciferasa de células T Jurkat de PD 1⁺TIGIT⁻ humanas. La Figura 10B muestra la
20 bioactividad de AZD2936 en ensayos de cocultivo de dos células reporteras de NFAT Luciferasa de células T Jurkat de PD-1⁻ TIGIT⁺ humanas. La Figura 10C muestra la bioactividad de AZD2936 en ensayos de cocultivo de dos células reporteras de NFAT luciferasa de células T Jurkat
25 de PD -1⁺TIGIT⁺ humanas. CD155 = grupo de diferenciación 155; CHO = ovario de hámster chino; NFAT = factor nuclear

de células T activadas; PD-1 = proteína de muerte celular programada 1; RLU = unidad de luz relativa; SD = desviación estándar; TCR = receptor de células T; TIGIT = inmunorreceptor de células T con Ig y dominios de motivos
5 inhibidores basados en tirosina inmunorreceptores.

Las Figuras 11A-11D muestran la actividad de destrucción celular de AZD2936 y la estimulación de liberación de IFN- γ en un ensayo de destrucción celular como se describe en el Ejemplo 4. La Figura 11A muestra
10 los datos de PBMC de cinco donantes. La Figura 11B muestra el aumento en veces del IFN- γ humano liberado de un ensayo de cocultivo de células T y células tumorales humanas en respuesta a AZD2936 y otros anticuerpos. La Figura 11C muestra una titulación de concentración de
15 anticuerpos de 10 nM a 0,1 pM. La Figura 11D muestra la media aritmética de EC50 de citotoxicidad para AZD2936 (n=6) en ensayos realizados de manera similar como en la Figura 11C.

Las Figuras 12A-12D muestran que AZD2936 tenía
20 una actividad antitumoral más fuerte que anti-PD-1 en el modelo de tumor OE21. Las líneas verticales con puntos en 12A y 12B muestran una dosificación del fármaco de inyección intraperitoneal (IP).

Las Figuras 13A-13D muestran que AZD2936 tuvo
25 una mayor actividad antitumoral que anti-PD-1 en el modelo de tumor PC9-MART1. Las líneas verticales con

puntos en 13A y 13B muestran una dosificación del fármaco de inyección intraperitoneal (IP).

Las Figuras 14A-14B muestran el porcentaje de células Jurkat que expresan PD-1 y TIGIT (Figura 14A) o
5 células Daudi (Figura 14B) vivas después de la incubación con AZD2936, control de isotipo IgG1-TM, rituximab o control de isotipo IgG1, junto con complemento que contiene suero humano o suero humano inactivado por calor como se describe en el Ejemplo 6. Las barras de error representan
10 SD (n = 2).

La Figura 15 muestra la destrucción específica de células Jurkat que expresan PD-1 y TIGIT o células Daudi por PBMC humanas primarias. La ADCC dependiente de la concentración estaba mediada por Rituximab pero no el
15 control de isotipo IgG1, AZD2936 o control de isotipo IgG1 TM como se describe en el Ejemplo 6. Las barras de error representan SD (n = 2).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La descripción se relaciona con proteínas de unión, que incluyen anticuerpos, que se unen a PD-1 y
5 TIGIT. La descripción también proporciona composiciones que comprenden tales proteínas de unión y moléculas de ácido nucleico que codifican tales proteínas de unión. La descripción también se relaciona con métodos para tratar un trastorno o afección usando tales proteínas de unión.

10 Como se usa de acuerdo con la presente descripción, a menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos deben entenderse que tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica. A menos que el contexto requiera
15 lo contrario, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

El término “anticuerpo”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una proteína que es
20 capaz de reconocer y unirse específicamente a un antígeno. Los anticuerpos comunes o de mamíferos convencionales comprenden un tetrámero, que típicamente se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, en donde cada par consiste en una cadena “ligera” (típicamente que tiene
25 un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una cadena “pesada” (típicamente que tiene un peso molecular de

alrededor de 50-70 kDa). Los términos “cadena pesada” y “cadena ligera”, como se usan en la presente descripción, se refieren a cualquier polipéptido de inmunoglobulina que tenga suficiente secuencia de dominio variable para 5 conferir especificidad para un antígeno diana. La porción amino terminal de cada cadena ligera y pesada incluye típicamente un dominio variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que típicamente son responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxilo terminal 10 de cada cadena define típicamente un dominio constante responsable de la función efectora. Por tanto, en un anticuerpo de origen natural, un polipéptido de inmunoglobulina de cadena pesada de longitud completa incluye un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes 15 (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}) y una región bisagra entre C_{H1} y C_{H2} , en donde el dominio V_H está en el amino-terminal del polipéptido y el dominio C_{H3} está en el carboxilo-terminal y un polipéptido de inmunoglobulina de cadena ligera de longitud completa incluye un dominio variable (V_L) y un 20 dominio constante (C_L), en donde el dominio V_L está en el amino-terminal del polipéptido y el dominio C_L está en el carboxilo-terminal. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que las ubicaciones de los dominios en un anticuerpo natural se pueden modificar en ciertos 25 formatos de proteína de unión similar a un anticuerpo sin una pérdida de capacidad de unión al antígeno. Las clases

de cadenas ligeras humanas se denominan cadenas ligeras kappa y lambda.

En algunos aspectos, la región constante de la cadena ligera es una cadena kappa. En algunos aspectos, la
5 región constante de la cadena ligera es una cadena lambda.

Dentro de las cadenas ligeras y pesadas de longitud completa, los dominios variables y constantes típicamente están unidos por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada
10 que también incluye una región “D” de aproximadamente 10 aminoácidos más. Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman típicamente un sitio de unión al antígeno. Los dominios variables de anticuerpos naturales exhiben típicamente la misma estructura general
15 de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par están típicamente alineadas por las regiones marco, lo que puede permitir la unión a un epítopo
20 específico. A partir del amino-terminal al carboxilo-terminal, los dominios variables de la cadena ligera y pesada comprenden típicamente los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4.

El término “fragmento de anticuerpo” se refiere
25 a una porción de una cadena intacta o de longitud completa o un anticuerpo, generalmente la unión o región

variable diana. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a fragmentos F_{ab} , $F_{ab'}$, $F_{(ab')_2}$ y F_v . Como se usa en la presente descripción, el término “fragmento funcional” es generalmente sinónimo de “fragmento de anticuerpo” y con respecto a anticuerpos, puede referirse a fragmentos de anticuerpos tales como F_v , F_{ab} , $F_{(ab')_2}$.

La referencia a la numeración de residuos de aminoácidos descritos en la presente descripción se realiza de acuerdo con el sistema de numeración de EU (también descrito en Kabat *et al*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th. Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

El término “vector” se refiere a cualquier molécula (*p. ej.*, ácido nucleico, plásmido o virus) que se usa para transferir información de codificación a una célula huésped. Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a una molécula de ADN bicatenario circular en la que se pueden insertar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en donde se pueden insertar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (*p. ej.*, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de vectores de mamíferos episomales y de replicación). Otros vectores (*p. ej.*, vectores de mamíferos no episomales) pueden

integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped y, por lo tanto, se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los
5 que están ligados operativamente. Tales vectores se denominan en la presente descripción “vectores de expresión”.

El término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente descripción, incluye anticuerpos que tienen
10 regiones variables y constantes que corresponden sustancialmente a las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En algunos aspectos, los anticuerpos humanos se producen en mamíferos no humanos, incluidos, entre otros, roedores, tales como ratones y
15 ratas, y lagomorfos, tales como conejos. En otros aspectos, los anticuerpos humanos se producen en células de hibridoma. En aun otros aspectos, los anticuerpos humanos se producen de manera recombinante. En algunos aspectos, la proteína de unión biespecífica es un
20 anticuerpo humano o humanizado.

El término “antígeno” o “antígeno diana”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula o una porción de una molécula que es capaz de ser reconocida por y unida por las proteínas de unión de la
25 descripción. El antígeno diana es capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un

epítopo de ese antígeno. Un antígeno diana puede tener uno o más epítopos.

El término “epítopo”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una región o elemento estructural de un antígeno que es reconocido y unido por una proteína de unión de la descripción. Más precisamente, el epítopo es la estructura específica que está unida por las CDR de la proteína de unión. Los epítopos pueden comprender elementos estructurales de proteínas, carbohidratos o incluso porciones de estructuras lipídicas que se encuentran en las membranas. Se dice que una proteína de unión se une específicamente a un antígeno cuando reconoce preferentemente su diana de antígeno en una mezcla compleja de proteínas y/o macromoléculas. El término “se une específicamente” se refiere a una proteína de unión que se une específicamente a una molécula o un fragmento de esta (p. ej., antígeno). Una proteína de unión que se une específicamente a una molécula o un fragmento de esta puede unirse a otras moléculas con menor afinidad como se determina, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore, u otros ensayos conocidos en la técnica. En particular, los anticuerpos o fragmentos que se unen específicamente a al menos una molécula o un fragmento de este pueden competir y sacar a moléculas que se unen no específicamente. La presente descripción abarca específicamente anticuerpos con múltiples especificidades (p. ej., un anticuerpo con

especificidad para dos o más antígenos discretos. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico puede unirse a dos epítopos adyacentes en un solo antígeno diana, o puede unirse a dos antígenos diferentes.

5 El término “sitio de unión al antígeno” como se usa en la presente descripción se refiere a un sitio creado en la superficie de una proteína de unión de la descripción donde se une un antígeno o un epítipo en un antígeno. El sitio de unión al antígeno de la proteína de
10 unión se describe típicamente por referencia a las estructuras de bucle creadas por regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la proteína de unión.

En algunos aspectos, las proteínas de unión proporcionadas en la presente descripción son
15 biespecíficas. Como se usa en la presente descripción, las proteínas de unión biespecíficas tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos independientes (o dianas) o epítopos diferentes dentro del mismo antígeno. Las proteínas de unión biespecíficas
20 de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes de una diana, o pueden unirse a dos dianas diferentes. Otras proteínas de unión tales pueden combinar un primer sitio de unión diana con un segundo sitio de unión para otra diana. En algunos aspectos, la proteína de unión es un
25 anticuerpo biespecífico.

En algunos aspectos, los anticuerpos
biespecíficos proporcionan efectos terapéuticos aditivos
y/o sinérgicos derivados de dirigirse a dos antígenos
simultáneamente, con la administración de una única
5 molécula fabricada.

En algunos aspectos, los anticuerpos
proporcionados en la presente descripción son anticuerpos
biespecíficos monovalentes (MBab). Los supercóntigos de
anticuerpo biespecíficos monovalentes descritos en la
10 presente descripción proporcionan una plataforma superior
para la generación de anticuerpos biespecíficos que
cumplen todos los beneficios asociados con anticuerpos
biespecíficos mientras reducen los riesgos terapéuticos
potenciales mencionados anteriormente debido a su
15 naturaleza monovalente. Además, los MBab proporcionados
en la presente descripción se expresan fácilmente, son
estables y probablemente tienen baja inmunogenicidad.
Como se usa en la presente descripción, el término
“biespecífico monovalente”, que puede abreviarse “MBab”,
20 se refiere a anticuerpos biespecíficos, en donde cada
brazo puede unirse específicamente a un antígeno diana
diferente y para un par dado de antígenos diana
diferentes (A y B), el MBab puede unirse a uno de cada
uno. En ciertos aspectos, los anticuerpos biespecíficos
25 monovalentes pueden unirse específicamente a dos
antígenos independientes (o dianas) o dos epítomos

independientes en el mismo antígeno. Típicamente, los anticuerpos biespecíficos monovalentes comprenden dos regiones variables diferentes. En algunos aspectos, la afinidad de unión para los dos antígenos independientes es aproximadamente igual. En algunos aspectos, las afinidades de unión para los dos antígenos independientes son diferentes.

En algunos aspectos proporcionados en la presente descripción se proporciona una proteína de unión biespecífica que se une específicamente a PD-1 y TIGIT que comprende: a) un primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1, en donde el primer dominio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 1, una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2 y una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 3, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 4, una LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 5 y una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 6; y b) un segundo dominio de unión que se une específicamente a TIGIT, en donde el segundo dominio de unión comprende un dominio variable de cadena pesada que

comprende una HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 11, una HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 12 y una HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13, y un dominio variable de cadena ligera que comprende una LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 14, una LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 15, y una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 16.

En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9. En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10.

En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,

97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 7. En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 9.

En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 8. En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 10.

En algunos aspectos, el segundo dominio de unión que se une específicamente a TIGIT comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 19. En algunos aspectos, el segundo dominio de unión que se une específicamente a TIGIT comprende una cadena pesada que

tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20.

En algunos aspectos, el segundo dominio de unión
5 que se une específicamente a TIGIT comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 17. En algunos aspectos, el
10 segundo dominio de unión que se une específicamente a TIGIT comprende un dominio variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.:
15 19.

En algunos aspectos, el segundo dominio de unión
que se une específicamente a TIGIT comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica
20 a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 18. En algunos aspectos, el segundo dominio de unión que se une específicamente a TIGIT comprende una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %
25 idéntica a la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 20.

En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende un dominio variable de cadena pesada que está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 21 y un dominio variable de cadena ligera está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 23. En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende una cadena pesada codificada por la secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 22 y una cadena ligera codificada por la secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 24.

En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende un dominio variable de cadena pesada que está codificado por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 21 y un dominio variable de cadena ligera está codificado por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 23.

En algunos aspectos, el primer dominio de unión que se une específicamente a PD-1 comprende una cadena pesada codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 22 y una cadena

ligera codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 24.

En algunos aspectos, el segundo dominio de unión
5 que se une específicamente a TIGIT comprende un dominio variable de cadena pesada que está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 25 y un dominio variable de cadena ligera que está codificado por la secuencia de ácido nucleico de la
10 sec. con núm. de ident.: 27. En algunos aspectos, el segundo dominio de unión que se une específicamente a TIGIT comprende una cadena pesada que está codificada por la secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 26 y una cadena ligera que está codificada por la
15 secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 28.

En algunos aspectos, el segundo dominio de unión que se une específicamente a TIGIT comprende un dominio variable de cadena pesada que está codificado por
20 una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 25 y un dominio variable de cadena ligera que está codificado por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 %
25 idéntica a la sec. con núm. de ident.: 27.

En algunos aspectos, el segundo dominio de unión que se une específicamente a TIGIT comprende una cadena pesada que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 5 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 26 y una cadena ligera que está codificada por una secuencia de ácido nucleico que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a la sec. con núm. de ident.: 28.

10 En un aspecto, las proteínas de unión biespecíficas útiles compiten con cualquier proteína de unión biespecífica contenida en la presente descripción para la unión tanto a PD-1 como a TIGIT. En un aspecto, una proteína de unión útil compite con un anticuerpo que 15 comprende las sec. con núm. de ident.: 7, sec. con núm. de ident.: 9, sec. con núm. de ident.: 17 y sec. con núm. de ident.: 19 para unirse tanto a PD-1 como a TIGIT. En otro aspecto, una proteína de unión útil compite con un anticuerpo que comprende las sec. con núm. de ident.: 8, 20 sec. con núm. de ident.: 10, sec. con núm. de ident.: 18 y sec. con núm. de ident.: 20 para unirse tanto a PD-1 como a TIGIT.

En un aspecto, la descripción proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos 25 que codifica una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción.

En un aspecto, la descripción proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción, donde la secuencia de ácido nucleico comprende uno o más de: una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 21, una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 23, una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 25 o una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 27. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 21, una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 23, una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 25, y secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 27.

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción comprende las sec. con núm. de ident.: 21, sec. con núm. de ident.: 23, sec. con núm. de ident.: 25 y sec. con núm. de ident.: 27.

En un aspecto, la descripción proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción, donde la secuencia de ácido nucleico comprende uno o más de: una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 22, una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 24, una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 26 o secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 28. En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 22, una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 24, una secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 26, y secuencia al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 28.

En un aspecto, la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción comprende las sec. con núm. de ident.: 22, sec. con núm. de ident.: 24, sec. con núm. de ident.: 26 y sec. con núm. de ident.: 28.

En un aspecto, la descripción proporciona una célula huésped que comprende un ácido nucleico como se describe en la presente descripción. En un aspecto, la descripción proporciona una célula huésped que comprende un vector que comprende un ácido nucleico como se describe en la presente descripción. En un aspecto, la descripción proporciona una célula huésped que tiene un ácido nucleico como se describe en la presente descripción integrado en su genoma.

En un aspecto, la descripción proporciona una célula huésped que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 21, una secuencia de ácido nucleico al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 23, una secuencia de ácido nucleico al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 25, y/o una secuencia de ácido nucleico al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 27.

En un aspecto, la descripción proporciona una célula huésped que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 22, una secuencia de ácido nucleico al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de

ident.: 24, una secuencia de ácido nucleico al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 26, y/o una secuencia de ácido nucleico al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a sec. con núm. de ident.: 28.

En un aspecto, la descripción proporciona una proteína de unión biespecífica producida por una célula huésped como se describe en la presente descripción.

El término "Fc nativo", como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula que comprende la secuencia de un fragmento de no unión al antígeno resultante de la digestión de un anticuerpo o producida por otros medios, ya sea en forma monomérica o multimérica, y puede contener la región bisagra. La fuente de inmunoglobulina original del Fc nativo es preferentemente de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas. Las moléculas de Fc nativo están compuestas de polipéptidos monoméricos que pueden enlazarse en formas dimericas o multiméricas por asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativo varía de 1 a 4 dependiendo de la clase (p. ej., IgG, IgA e IgE) o subclase (p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 e IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por disulfuro resultante de la digestión con papaína de una IgG. El término "Fc nativo"

como se usa en la presente descripción es genérico a las formas monoméricas, diméricas y multiméricas.

En algunos aspectos, la región Fc es o incluye un dominio que es una o más de una región Fc de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgE o IgD. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1.

El término “variante de Fc”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula o secuencia que se modifica de un Fc nativo pero aún comprende un sitio de unión para el receptor de rescate, FcRn (receptor de Fc neonatal). Las variantes de Fc ilustrativas y su interacción con el receptor de rescate son conocidas en la técnica. Por lo tanto, el término “variante de Fc” puede comprender una molécula o secuencia que se humaniza a partir de un Fc nativo no humano. Además, un Fc nativo comprende regiones que pueden eliminarse o mutarse para producir una variante de Fc para alterar ciertos residuos que proporcionan características estructurales o actividad biológica que no son necesarias para las proteínas de unión de la descripción. Por lo tanto, el término “variante de Fc” comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos de Fc nativo, o en los que uno o más sitios o residuos de Fc han sido modificados, que afectan o están involucrados en: (1) formación de enlaces disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una

célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) unión a un receptor Fc distinto de un receptor de rescate, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

5 En algunos aspectos, la proteína de unión
bienespecífica comprende una región Fc variante que
comprende al menos una sustitución seleccionada de 221K,
221Y, 225E, 225K, 225W, 228P, 234D, 234E, 234N, 234Q,
234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R,
10 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I,
235V, 235E, 235F, 236E, 237L, 237M, 237P, 239D, 239E,
239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T,
240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L 243Y,
243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 250E, 250Q,
15 251F, 252L, 252Y, 254S, 254T, 255L, 256E, 256F, 256M,
257C, 257M, 257N, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A,
263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M,
264Y, 264E, 265A, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V,
265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q,
20 267L, 268E, 269H, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M,
292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L,
296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298A, 298H, 298I,
298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F,
299E, 305I, 308F, 313F, 316D, 318A, 318S, 320A, 320S,
25 322A, 322S, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T,
325V, 325H, 326A, 326D, 326E, 326G, 326M, 326V, 327G,

327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q,
328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q,
330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F,
330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K,
5 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R,
331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N,
332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 333A, 333D, 333G, 333Q,
333S, 333V, 334A, 334E, 334H, 334L, 334M, 334Q, 334V,
334Y, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H,
10 421K, 428L, 428F, 433K, 433L, 434A, 434W, 434Y, 436H,
440Y y 443W como se enumeran por el índice EU como se
establece en Kabat.

En algunos aspectos, la región Fc variante
comprende una o más modificaciones en las posiciones
15 seleccionadas de 428 y 434 como se enumeran por el índice
EU como se establece en Kabat. En algunos aspectos, la
región Fc variante comprende una o más sustituciones de
aminoácidos en posiciones seleccionadas de 428 y 434 como
se enumeran por el índice EU como se establece en Kabat.
20 En algunos aspectos, la región Fc variante comprende una
o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de 428L,
428F, 434A, 434W y 434Y.

La ingeniería genética de la región Fc se usa
ampliamente en la técnica para extender la vida media de
25 los anticuerpos terapéuticos y proteger de la degradación
in vivo. En algunos aspectos, la región Fc de un

anticuerpo IgG o fragmento de unión al antígeno se puede modificar para aumentar la afinidad de la molécula de IgG para el neonato de receptor Fc (FcRn), que media el catabolismo de IgG y protege las moléculas de IgG de la degradación.

En la técnica se conocen otras sustituciones o modificaciones de aminoácidos de la región Fc adecuadas e incluyen, por ejemplo, la sustitución triple de metionina (M) a tirosina (Y) en la posición 252, una sustitución de serina (S) a treonina (T) en la posición 254, y una sustitución de treonina (T) a ácido glutámico (E) en la posición 256, enumeradas de acuerdo con el índice EU según Kabat (M252Y/S254T/T256E; denominada “YTE” o “mutación YTE”) (ver, p. ej., la patente de los EE. UU. núm. 7.658.921; publicación de solicitud de patente de los EE. UU. 2014/0302058; y Yu et al., Antimicrob. Agents Chemother., 61(1): e01020-16 (2017), cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad).

En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región Fc que se ha modificado genéticamente para mejorar la semivida. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una región Fc con una mutación YTE.

En algunos aspectos, la región Fc es aglicosilada. En algunos aspectos, la región Fc es desglicosilada. En algunos aspectos, la región Fc tiene fucosilación reducida o es afucosilada.

5 En algunos aspectos, la variante de anticuerpo o fragmento de unión de este tiene una mayor afinidad de unión por FcRn.

La mutación triple (TM) L234F/L235E/P331S (de acuerdo con la convención de numeración de la Unión Europea, Sazinsky et al. Proc Natl Acad Sci USA, 10 105:20167-20172 (2008) en la región constante de la cadena pesada puede reducir significativamente la función efectora de IgG. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este comprende una 15 región Fc con una mutación triple (TM) L234F/L235E/P331S.

En algunos aspectos, la variante de anticuerpo Fc o fragmento de unión de este ha reducido la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) cuando se administra in vivo. En algunos aspectos, la variante de anticuerpo Fc o 20 fragmento de unión de este tiene CDC reducida en comparación con un anticuerpo o variante de unión de este que contiene una región Fc silvestre. En algunos aspectos, la variante de anticuerpo o fragmento de unión de este no desencadenó CDC cuando se administra in vivo. En algunos 25 aspectos, la variante de anticuerpo o fragmento de unión de este causa CDC reducida cuando se administra in vivo. En

algunos aspectos, la variante de anticuerpo Fc o fragmento de unión de este que tiene actividad de CDC reducida o ninguna actividad de CDC comprende la mutación triple (L234F/L235E/P331S) en la región Fc variante.

5 En algunos aspectos, la variante de anticuerpo Fc o fragmento de unión de este tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) reducida cuando se administra in vivo. En algunos aspectos, la variante de anticuerpo Fc o fragmento de unión de este tiene ADCC
10 reducida en comparación con un anticuerpo o variante de unión de este que contiene una región Fc silvestre. En algunos aspectos, la variante de anticuerpo o fragmento de unión de este no desencadenó ADCC cuando se administra in vivo. En algunos aspectos, la variante de anticuerpo o
15 fragmento de unión de este causa ADCC reducida cuando se administra in vivo. En algunos aspectos, la variante de anticuerpo Fc o fragmento de unión de este que tiene actividad de ADCC reducida o ninguna actividad de ADCC comprende la mutación triple (L234F/L235E/P331S) en la
20 región Fc variante.

 En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión de este que tiene actividad de CDC reducida tiene una toxicidad reducida cuando se administra a un sujeto. En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de
25 unión de este que tiene actividad de ADCC reducida tiene una toxicidad reducida cuando se administra a un sujeto.

El término “dominio Fc”, como se usa en la presente descripción, abarca Fc nativo y variantes de Fc como se definió anteriormente. Al igual que con las moléculas de variantes de Fc y Fc nativo, el término “dominio Fc” incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sea digeridas de todo el anticuerpo o producidas por otros medios.

Para mejorar los rendimientos de las proteínas de unión, los dominios de C_{H3} pueden alterarse mediante la tecnología de “botones en ojales” que se describe en detalle con varias moléculas ilustrativas, por ejemplo, en la publicación internacional núm. WO 96/027011, Ridgway *et al.*, 1996, *Protein Eng.* 9: 617-21; y Merchant *et al.*, 1998, *Nat. Biotechnol.* 16: 677-81. Específicamente, las superficies de interacción de los dos dominios de C_{H3} se alteran para aumentar la heterodimerización de ambas cadenas pesadas que contienen estos dos dominios de C_{H3}. Cada uno de los dos dominios de C_{H3} (de las dos cadenas pesadas) pueden ser el “botón”, mientras que el otro es el “ojal”. La introducción de un puente disulfuro estabiliza adicionalmente los heterodímeros (Merchant *et al.*, 1998; Atwell *et al.*, 1997, *J. Mol. Biol.* 270: 26-35) y aumenta el rendimiento.

En algunos aspectos, las proteínas de unión tienen un formato “DuetMab”. El DuetMab tiene la siguiente

estructura básica: una región Fc que tiene una cadena pesada modificada, en donde la región de C_{H1} de la cadena pesada modificada tiene una sustitución de un aminoácido de cisteína nativo a uno de no cisteína, y una sustitución de un aminoácido de no cisteína nativo a un aminoácido de cisteína; una cadena ligera correspondiente modificada, donde la región de C_L de la cadena ligera modificada también tiene una sustitución de un aminoácido de cisteína nativo a uno de no cisteína, y una sustitución de un aminoácido de no cisteína nativo a un aminoácido de cisteína; una segunda región Fc que tiene una segunda cadena pesada; y segunda cadena ligera modificada correspondiente, donde la cadena pesada modificada se enlaza directamente a la cadena ligera modificada correspondiente, y en un brazo de unión a la diana separado, la segunda cadena pesada se une directamente a la segunda cadena ligera correspondiente, y donde la cisteína sustituida de la cadena pesada modificada, que resulta de la sustitución del aminoácido de no cisteína nativo al aminoácido de cisteína, y la cisteína sustituida de la cadena ligera correspondiente modificada, que resulta de la sustitución del aminoácido de no cisteína nativo al aminoácido de cisteína, puede formar un enlace disulfuro. La descripción relacionada con el DuetMab puede encontrarse, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm.

9.527.927, incorporada en la presente descripción como referencia en su totalidad.

El término " K_D ," como se usa en la presente descripción, se refiere a la constante de disociación (K_D = $[A] \times [B]/[AB]$) de la interacción entre una proteína de unión la descripción y un antígeno diana y tiene las unidades de moles/litro. Una proteína de unión de la descripción típicamente tiene una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} a 10^{-12} moles/litro o menos, o 10^{-7} a 10^{-12} moles/litro o menos, o 10^{-3} a 10^{-12} moles/litro y/o con una afinidad de unión de al menos 10^7 M^{-1} , o al menos 10^8 M^{-1} , o al menos 10^9 M^{-1} , o al menos 10^{12} M^{-1} . Cualquier valor de K_D mayor que 10^{-4} moles/litro por lo general, se considera que indica una unión no específica. Por lo tanto, cuanto menor sea el valor de K_D , mayor es la afinidad. En algunos aspectos, una proteína de unión de la descripción se unirá a un antígeno deseado con una afinidad menor de 500 nM, o menor de 200 nM, o menor de 10 nM, o menor de 500 pM. Una unión muy alta o muy fuerte se asocia, frecuentemente, con una mayor eficacia, pero no siempre es el caso que cuanto mayor sea la afinidad, mayor será la eficacia.

La constante de disociación (K_D) se puede determinar, por ejemplo, mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR). En general, el análisis de resonancia de plasmones superficiales mide las interacciones de unión

en tiempo real (tanto en tasa como fuera de tasa) entre un
ligando (un antígeno diana en una matriz biosensora) y un
analito mediante resonancia de plasmones superficiales
usando, por ejemplo, el sistema BIAcore® (Pharmacia
5 Biosensor; Piscataway, NJ). También se puede realizar el
análisis de plasmones superficiales al inmovilizar el
analito y presentar el ligando. La unión específica de la
proteína de unión de la descripción a un antígeno o
determinante antigénico también puede determinarse de
10 cualquier manera adecuada conocida en la técnica, que
incluye, por ejemplo, análisis de dispersión y/o ensayos de
unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA),
ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA),
inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos de competencia de
15 sándwich.

En un aspecto, la constante de disociación de
equilibrio (K_D) de una interacción de una proteína de unión
bienespecífica como se describe en la presente descripción
con TIGIT humano es menor o igual que aproximadamente 15
20 pM. En un aspecto, la K_D de una interacción de una proteína
de unión bienespecífica como se describe en la presente
descripción con TIGIT humano es menor o igual que
aproximadamente 9 pM. En un aspecto, la K_D de una
interacción de una proteína de unión bienespecífica como se
25 describe en la presente descripción con TIGIT humano es

menor o igual que aproximadamente 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, u 8 pM.

En un aspecto, la K_D de una interacción de una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción con TIGIT humano es de aproximadamente 9 pM a aproximadamente 15 pM. En un aspecto, la K_D de una interacción de una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción con TIGIT humano es de aproximadamente 10 pM a aproximadamente 15 pM. En un aspecto, la K_D de una interacción de una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción con TIGIT humano es de aproximadamente 11 pM a aproximadamente 15 pM. En un aspecto, la K_D de una interacción de una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción con TIGIT humano es de aproximadamente 12 pM a aproximadamente 15 pM. En un aspecto, la K_D de una interacción de una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción con TIGIT humano es de aproximadamente 13 pM a aproximadamente 15 pM. En un aspecto, la K_D de una interacción de una proteína de unión biespecífica como se describe en la presente descripción con TIGIT humano es de aproximadamente 14 pM a aproximadamente 15 pM.

En un aspecto, la K_D de una interacción de una proteína de unión biespecífica como se describe en la

presente descripción con PD-L1 humano es menor que o
igual a aproximadamente 0,4 nM. En un aspecto, la K_D de
una interacción de una proteína de unión biespecífica
como se describe en la presente descripción con PD-L1
5 humano es de aproximadamente 0,2 nM a aproximadamente 0,5
nM. En un aspecto, la K_D de una interacción de una
proteína de unión biespecífica como se describe en la
presente descripción con PD-L1 humano es de
aproximadamente 0,3 nM a aproximadamente 0,5 nM. En un
10 aspecto, la K_D de una interacción de una proteína de
unión biespecífica como se describe en la presente
descripción con PD-L1 humano es de aproximadamente 0,4 nM
a aproximadamente 0,5 nM.

En aspectos particulares proporcionados en la
15 presente descripción, es un método para tratar a un
sujeto que tiene una enfermedad o afección que comprende
administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente
efectiva de las proteínas de unión descritas en la
presente descripción. La descripción proporciona métodos
20 para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, así
como métodos para tratar o prevenir un tumor y/o cáncer
en un sujeto mediante la administración de las proteínas,
moléculas de ácido nucleico y/o composiciones al sujeto.

En aspectos particulares proporcionados en la
25 presente descripción, es un método para inducir una
respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende

administrar al sujeto una proteína biespecífica como se describe en la presente descripción. En un aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende
5 administrar al sujeto un ácido nucleico como se describe en la presente descripción. En un aspecto, en la presente descripción se proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica como se
10 describe en la presente descripción.

En un aspecto, en la presente descripción se proporciona una proteína biespecífica como se define en la presente descripción para usar en terapia. En un aspecto, en la presente descripción se proporciona una
15 proteína biespecífica como se define en la presente descripción para usar en el tratamiento del cáncer. En un aspecto, en la presente descripción se proporciona el uso de una proteína biespecífica como se define en la presente descripción en la elaboración de un medicamento
20 para el tratamiento del cáncer. En un aspecto, en la presente descripción se proporciona un ácido nucleico como se define en la presente descripción para usar en terapia. En un aspecto, en la presente descripción se proporciona un ácido nucleico como se define en la
25 presente descripción para usar en el tratamiento del cáncer. En un aspecto, en la presente descripción se

proporciona el uso de un ácido nucleico como se define en la presente descripción en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En un aspecto, el método de tratamiento
5 comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de las proteínas de unión descritas en la presente descripción en combinación con un compuesto contra el cáncer adicional. En algunos aspectos, el compuesto contra el cáncer es un fármaco de
10 molécula pequeña. En algunos aspectos, el compuesto contra el cáncer es pemetrexed, carboplatino, gemcitabina, cisplatino, paclitaxel o combinaciones de estos. En algunos aspectos, la proteína de unión y el tratamiento contra el cáncer adicional se administran
15 simultáneamente. En algunos aspectos, la proteína de unión y el tratamiento contra el cáncer adicional no se administran simultáneamente, sino que se administran durante el mismo curso de tratamiento.

Una “enfermedad” o “afección” se refiere a
20 cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento usando los métodos de la descripción. “Enfermedad” y “afección” se usan indistintamente en la presente descripción e incluyen trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluidas aquellas afecciones patológicas que
25 predisponen a un paciente al trastorno en cuestión. En algunos aspectos, la enfermedad es un tumor. En algunos

aspectos, la enfermedad es un tumor sólido. En algunos aspectos, la enfermedad es cáncer. En algunos aspectos, el cáncer es uno o más de cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de cuello
5 uterino, cáncer de útero, cáncer testicular, cáncer de vejiga, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer de páncreas, carcinoma de células renales y cáncer de pulmón. En algunos aspectos, la enfermedad es cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). En algunos aspectos, el NSCLC
10 es avanzado o metastásico. En algunos aspectos, el NSCLC avanzado es NSCLC de estadio III o estadio IV.

El término “sujeto” pretende incluir animales humanos y no humanos, particularmente mamíferos. En ciertos aspectos, el sujeto es un paciente humano.

15 Los términos “tratamiento” o “tratar” como se usan en la presente descripción se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen sujetos que tienen una enfermedad o afección,
20 así como aquellos propensos a tener enfermedad o afección o aquellos para las que se va a prevenir una enfermedad o afección.

Los términos “administración” o “administrar” como se usan en la presente descripción se refieren a
25 proporcionar, poner en contacto y/o suministrar un compuesto o compuestos por cualquier vía apropiada para

lograr el efecto deseado. La administración puede incluir, pero no se limita a, oral, sublingual, parenteral (p. ej.,., inyección intravenosa, subcutánea, intracutánea, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasínovial, intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal), transdérmica, tópica, bucal, rectal, vaginal, nasal, oftálmica, a través de inhalación e implantes.

Los términos “coadministrado” o “en combinación” como se usan en la presente descripción se refieren a la administración simultánea o secuencial de múltiples compuestos o agentes. Un primer compuesto o agente puede administrarse antes, al mismo tiempo o después de la administración de un segundo compuesto o agente. El primer compuesto o agente y el segundo compuesto o agente pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente al mismo día, o pueden administrarse secuencialmente dentro de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o 1 mes entre sí. En algunos aspectos, los compuestos o agentes se coadministran durante el período en el que cada uno de los compuestos o agentes ejerce al menos algún efecto fisiológico y/o tiene eficacia restante.

Los términos “composición farmacéutica” o “composición terapéutica”, como se usan en la presente descripción, se refieren a un compuesto o composición capaz

de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un sujeto. En algunos aspectos, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador aceptable desde el punto de vista
5 farmacéutico y una cantidad terapéuticamente efectiva de proteínas de unión de la descripción.

Una “dosis terapéuticamente efectiva” o “dosis terapéutica” es una cantidad suficiente para efectuar los resultados clínicos deseados (*es decir*, lograr eficacia
10 terapéutica). Se puede administrar una dosis terapéuticamente efectiva en una o más administraciones.

Los términos “portador farmacéuticamente aceptable” o “portador fisiológicamente aceptable”, como se usan en la presente descripción, se refieren a uno o
15 más materiales de formulación adecuados para lograr o mejorar la administración de una o más proteínas de unión de la descripción.

En algunos aspectos, las proteínas de unión descritas en la presente descripción pueden formularse con
20 un portador, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable, como composiciones farmacéuticas. En ciertos aspectos, tales composiciones farmacéuticas son adecuadas para la administración a un animal humano o no humano a través de una o más vías de administración usando métodos
25 conocidos en la técnica. El término “portador

farmacéuticamente aceptable” significa uno o más materiales no tóxicos que no interfieren con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Tales preparaciones pueden contener habitualmente sales, agentes
5 amortiguadores, conservantes, portadores compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Tales preparaciones farmacéuticamente aceptables también pueden contener agentes de relleno sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias encapsulantes compatibles que son adecuadas
10 para su administración en un ser humano. Otros portadores, excipientes y/o aditivos contemplados, que pueden usarse en las formulaciones descritas en la presente descripción incluyen, por ejemplo, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes
15 antiestáticos, lípidos, excipientes de proteínas tales como albúmina sérica, gelatina, caseína, contraiones formadores de sal tales como sodio y lo similar. Estos y portadores, excipientes y/o aditivos farmacéuticos conocidos adicionales adecuados para usar en las formulaciones
20 descritas en la presente descripción se conocen en la técnica, por ejemplo, como se enumeran en “Remington: The Science & Practice of Pharmacy,” 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005), y en “Physician's Desk Reference,” 60th ed., Medical Economics, Montvale, N.J.
25 (2005). Los portadores farmacéuticamente aceptables se

pueden seleccionar que son adecuados para el modo de administración, solubilidad y/o estabilidad deseada o requerida.

En algunos aspectos, las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen un compuesto 5 contra el cáncer adicional. En algunos aspectos, el compuesto contra el cáncer es un fármaco de molécula pequeña. En algunos aspectos, el compuesto contra el cáncer es pemetrexed, carboplatino, gemcitabina, 10 cisplatino, paclitaxel o combinaciones de estos. En algunos aspectos, el compuesto contra el cáncer es pemetrexed. En algunos aspectos, el compuesto contra el cáncer es carboplatino. En algunos aspectos, el compuesto contra el cáncer es gemcitabina. En algunos aspectos, el 15 compuesto contra el cáncer es cisplatino. En algunos aspectos, el compuesto contra el cáncer es paclitaxel.

En un aspecto, las formulaciones de la descripción son formulaciones libres de pirógeno que son sustancialmente libres de endotoxinas y/o sustancias 20 pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y se liberan solo cuando los microorganismos se descomponen o mueren. Las sustancias pirogénicas también incluyen sustancias termoestables que inducen fiebre 25 (glicoproteínas) de la membrana externa de bacterias y otros microorganismos. Ambas sustancias pueden causar

fiebre, hipotensión y shock si se administran a humanos. Debido a los potenciales efectos dañinos, incluso las cantidades bajas de endotoxinas deben eliminarse de las soluciones farmacéuticas administradas por vía intravenosa.

5 La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (“FDA”) ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (EU) por dosis por kilogramo de peso corporal en un solo período de una hora para aplicaciones intravenosas de medicamentos (The United

10 States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1): 223 (2000)). En ciertos aspectos, los niveles de endotoxina y pirógeno en la composición son menores de 10 EU/mg, o menores de 5 EU/mg, o menores de 1 EU/mg, o menores de 0,1 EU/mg, o menores de 0,01 EU/mg, o menores de 0,001 EU/mg.

15 Cuando se usa para administración *in vivo*, las formulaciones de la descripción deben ser estériles. Las formulaciones de la descripción se pueden esterilizar mediante diversos métodos de esterilización, incluidos, por ejemplo, filtración estéril o radiación. En un

20 aspecto, la formulación se esteriliza por filtración con un filtro preesterilizado de 0,22 micrones. Las composiciones estériles para inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional como se describe en “Remington: The Science & Practice of

25 Pharmacy,” 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005).

En algunos aspectos, las composiciones terapéuticas pueden formularse para vías de administración particulares, tales como la administración oral, nasal, pulmonar, tópica (incluida bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Los términos “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral”, como se usan en la presente descripción, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección e incluyen, sin limitarse a, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtracheal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión. Las formulaciones de la descripción que son adecuadas para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. Los anticuerpos y otros activos pueden mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, regulador o propulsor que pueda ser requerido (ver, p. ej., las patentes de los EE. UU. núms. 7.378.110; 7.258.873; y 7.135.180; las publicaciones de solicitudes de patentes de los EE.UU. núms. 2004/0042972 y 2004/0042971).

Las formulaciones se pueden presentar en forma de dosis unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de farmacia. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el paciente (p. ej., “una cantidad terapéuticamente efectiva”). El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se use, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se trata, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Estas dosis se pueden administrar diariamente, semanalmente, quincenalmente, mensualmente o menos frecuentemente, por ejemplo, semestralmente, dependiendo de la dosis, método de administración, trastorno o síntomas a tratar, y características

individuales de los sujetos. Las dosificaciones también se pueden administrar mediante infusión continua (tal como a través de una bomba). La dosis administrada también puede depender de la vía de administración. Por ejemplo, la administración subcutánea puede requerir una dosis más alta que la administración intravenosa. Como se indicó anteriormente, cualquier régimen de dosificación usado comúnmente (p. ej., 1-10 mg/kg administrados por inyección o infusión diaria o dos veces a la semana) pueden adaptarse y adecuarse en los métodos relacionados con el tratamiento de pacientes con cáncer humanos.

Todas las referencias citadas en la presente descripción, incluidas las patentes, solicitudes de patentes, investigaciones, libros de texto y lo similar, y las referencias citadas en estas, en la medida en que no lo estén ya, se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Sin limitar la descripción, se describen en la presente varios aspectos de la descripción con fines ilustrativos.

Ejemplos

Los ejemplos a continuación son ilustrativos de aspectos específicos de la descripción, y varios usos de estos. Se exponen solo a fines explicativos y no deben

interpretarse como limitantes del alcance de la descripción de ninguna manera.

Ejemplo 1: Generación y caracterización de la porción

5 Anti-TIGIT de anticuerpos biespecíficos

Se desarrolló y caracterizó una serie de anticuerpos TIGIT monoclonales. Se revisaron las secuencias en WT de VAR1 parental (P-VAR1) de cadenas pesada y ligera variables (VL WT + VH WT). En la cadena
10 pesada variable, se identificó un riesgo potencial de oxidación de metionina en la región de CDRH3 y se identificó un riesgo potencial de fragmentación de DP en la región de CDRH3 (Figura 1). En la cadena ligera variable, se identificó un riesgo potencial de oxidación
15 de metionina en la región CDRL1 (Figura 2). Se generaron cinco variantes de anticuerpos monoclonales para eliminar esta oxidación potencial y para igualar las secuencias de la línea germinal (GL):

VL WT + VH WT;
20 VL GL + VH WT;
VL WT + VH GL;
VL GL + VH GL;
VL GL (CDRL1 M-I) + VH GL

Específicamente, en la región pesada variable,
25 el primer aminoácido E se mutó a Q para que coincida con la secuencia de la línea germinal. En la región pesada

variable, el residuo de metionina en CDRL1 se mutó en una variante a isoleucina como en la secuencia de línea germinal para mitigar la oxidación potencial. Los dominios VH y VL de P-VAR1 se modificaron exitosamente
5 sin afectar la productividad y la cinética de la variante. (Tabla 1, Figuras 5 y 6). Además, las variantes no exhibieron pérdida de monómeros, agregación o fragmentación significativas en un ensayo de estabilidad térmica acelerada (Tabla 2).

10

Tabla 1: Expresión de la variante de duetMab y propiedades de apareamiento

ID. de muestra	Volumen de cultivo	Titulación de día 10/12* (mg/l)	% de LC emparejada correcta	% de monómero MabSelect Sure	Cromatografía κ/λ	% final de monómero	% final de LC emparejado correcto	Nivel de endotoxina	Rendimiento Final
VL WT + VH WT	500 ml	72,2	92	82	Kappa	100	99	<0,1 EU/mg	4 mg
VL GL + VH WT	500 ml	60,8	98	82	Na	100	98	<0,3 EU/mg	5 mg
VL WT + VH GL	500 ml	60,5	97	86,5	na	100	97	<0,5 EU/mg	5 mg
VL GL + VH GL	500 ml	66,7	96	84	na	100	96	<0,1 EU/mg	7 mg
VL GL (CDRL1 M-I) + VH GL	500 ml	65,2	96	83	na	100	96	<0,5 EU/mg	8 mg

Todas las variantes se sometieron a un ensayo de estabilidad térmica acelerada a 45 °C durante 2 semanas en 1 mg/ml de regulador PBS. La pérdida de monómero, agregación y fragmentación se midieron tanto antes como
5 después del almacenamiento a alta temperatura usando técnicas estándar, con los resultados proporcionados en la Tabla 2.

Tabla 2: Pérdida de monómero, agregación o fragmentación en un ensayo de estabilidad térmica acelerada para las variantes DuetMab de PD1/TIGIT

Nombre del clon	Retención de monómeros (min)	Pureza de inicio después de la proteína A			Posterior a 45 °C, 2 semanas, 1 mg/ml de PBS			Cambio		
		% de monómero	% de agregado	% de fragmento	% de monómero	% de agregado	% de fragmento	% de pérdida de monómero	% de aumento en el agregado	% de aumento en el fragmento
P-VAR1 w.t. DuetMab	9,2	100,0	0,0	0,0	97,6	0,0	2,4	2,4	0,0	2,4
VAR1 VL GL (CDRL1 M-I) + DuetMab de VH GL	9,2	100,0	0,0	0,0	97,8	0,0	2,2	2,2	0,0	2,2
VL GL + DuetMab de VH GL	9,2	100,0	0,0	0,0	98,0	0,2	1,8	2,0	0,2	1,8

Se evaluó la cinética intrínseca de LO115/P-VAR1 (VHWT-VLWT) y VAR1 (LO115/VHGL-VLGL (M-I)) de duetMab de PD1-TIGIT a través de BiaCore de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los experimentos de unión se llevaron a cabo usando un instrumento BIAcore T200 (BIAcore). Los resultados de la unión se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Cinética intrínseca de DuetMab de PD-1/TIGIT por BiaCore

Ligando	Muestra	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Chi2 (RU2)
huTIGIT	P-VAR1	4,67E+06	4,64E-05	9,9E-12	0,0119
huTIGIT	VAR1	4,37E+06	6,57E-05	15,0E-12	0,0150
cyTIGIT	P-VAR1	1,03E+06	3,29E-02	32,1E-9	0,7350
cyTIGIT	VAR1	9,99E+05	4,11E-02	41,1E-9	1,3400
muTIGIT	P-VAR1	1,66E+06	3,78E-03	2,3E-9	0,1350
muTIGIT	VAR1	2,17E+06	6,31E-03	2,9E-9	0,0285

Ejemplo 2: Proteínas de unión biespecíficas a PD-1/TIGIT y caracterización de proteínas de unión

Se creó una proteína de unión biespecífica en el formato DuetMab que se une a PD-1 y TIGIT usando las secuencias de la Tabla 4 a continuación. Las CDR en la Tabla 4 se resaltan con base en el sistema de definición de Kabat.

Tabla 4: Secuencias de AZD2936

PD1 LO115 HCDR1	sec. con núm. de ident.: 1	DYGMH
PD1 LO115 HCDR2	sec. con núm. de ident.: 2	YISSGSYTIYSADSVKG
PD1 LO115 HCDR3	sec. con núm. de ident.: 3	RAPNSFYEYFDY
PD1 LO115 LCDR1	sec. con núm. de ident.: 4	SASSKHTNLYWSRHY
PD1 LO115 LCDR2	sec. con núm. de ident.: 5	LTSNRAT
PD1 LO115 LCDR3	sec. con núm. de ident.: 6	QQWSSNPFT
Cadena pesada variable de PD1 LO115	sec. con núm. de ident.: 7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SDYGMHWVRQAPGKGLEWVAYIS SGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARRAPNSF YEYFDYWGQGTITVTVSS
Cadena pesada entera de PD1 LO115	sec. con núm. de ident.: 8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DYGMHWVRQAPGKGLEWVAYIS SGSYTIYSADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARRAPNSF YEYFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLTQDNLNGKEYKCKVSNKALPASEIEKTI SKAKGQPREPQVCTLPSSREEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena ligera variable de PD1 LO115	sec. con núm. de ident.: 9	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHT NLYWSRHYWYQQKPGQAPRLLIY LTSNRATGIPARFSGSGSDFTLTITSSLEP EDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTK LEIK
Cadena ligera Kappa WT de PD1 LO115	sec. con núm. de ident.: 10	QIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSKHT NLYWSRHYWYQQKPGQAPRLLIY LTSNRATGIPARFSGSGSDFTLTITSSLEP EDFAVYYCQQWSSNPFTFGQGTK LEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
TIGIT VAR1 HCDR1	sec. con núm. de ident.: 11	SYAMH
TIGIT VAR1 HCDR2	sec. con núm. de ident.: 12	VISYAGEVKYYADSVKG
TIGIT VAR1 HCDR3	sec. con núm. de ident.: 13	DPLPLHYGMDV
TIGIT VAR1 LCDR1	sec. con núm. de ident.: 14	SGSSSNIGRRPVN
TIGIT VAR1 LCDR2	sec. con núm. de ident.: 15	SQNQRPS
TIGIT VAR1 LCDR3	sec. con núm. de ident.: 16	AVWDDIGRVLQ
Cadena pesada variable de TIGIT VAR1	sec. con núm. de ident.: 17	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAVIS YAGEVKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDPLPLH YYGMDVWGQGTITVTVSS

Cadena pesada de botón de TIGIT VAR1	sec. con núm. de ident.: 18	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVI SYAGEVKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPLP LHYYGMDVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVCLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVPEKSVDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP CREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Cadena ligera variable de TIGIT VAR1	sec. con núm. de ident.: 19	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGRRPVNWYQQLPGTAPKLLIYSQNO RPSGVPDRFSGSQSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAVWDDIGRVLQLGGGTQLT VL
Cadena ligera Lambda modificada genéticamente de TIGIT VAR1	sec. con núm. de ident.: 20	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGRRPVNWYQQLPGTAPKLLIYSQ NQRPSGVPDRFSGSQSGTSASLAISGLQSEDEADYFCAVWDDIGRVLQLGGG TQLTVLQGPKAAPSVTLPFPCCSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTTPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTEVS
Cadena pesada variable de PD1 LO115	sec. con núm. de ident.: 21	GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCC TGAGACTGTCTTGCGCCGCTCCGGCTTCACATTCTCCGACTACGGCATGCA CTGGGTCCGACAGGCCCTTGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTACATCTCC TCCGGCTCCTACACCATCTACTCCGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCA TCTCCCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCG GGCCGAGGACACAGCCGTGTACTACTGTGCCAGACGGGCCCCTAACCTCCTC TACGAGTACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTC CT
Cadena pesada entera de PD1 LO115	sec. con núm. de ident.: 22	GAGGTGCAGCTGGTGAATCCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCT GAGACTGTCTTGCGCCGCTCCGGCTTCACATTCTCCGACTACGGCATGCACT GGGTCCGACAGGCCCTTGAAAGGGCCTGGAATGGGTGGCTACATCTCCTCC GGCTCCTACACCATCTACTCCGCCGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTC CCGGGACAACGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAGATGAACCTCCCTGCGGGCCG AGGACACAGCCGTGTACTACTGTGCCAGACGGGCCCCTAACCTCCTTCTACGAG TACTACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTGTCTCTGTCTAG CACCAAAGGTCCGAGCGTTTTTCCGCTGGCACCGAGCAGAAAAGCACCTCTG GTGGCACCAGCAGCACTGGGTTGTCTGGTGAAAGATTATTTCCGGAACCGTT ACCGTTTCTTGAATAGCGGTGCACTGACCAGCGGTGTTACATACCTTTCCGGC AGTTCTGCAGAGCAGCGGTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCGA GCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTGCAATGTGAATCATAAACCGAGC AATACAAAAGTTGATAAACGCGTTGAACCGAAAAGCTGTGACAAAACCTCACAC GTGCCCACCGTGCCAGCACCTGAGTTTCGAGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT TCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA TGCGTGGTGGTGAGCTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGACGCGGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCAG CATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTCT GCACCCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAGC TGCGCGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACACGCTCCCGTGGTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCGTTAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATGA
Cadena ligera variable de PD1 LO115	sec. con núm. de ident.: 23	CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCCTGAGCCCTGGCGAGAGA GCCACCCTGAGCTGCTCCGCTCCTCCAAGCACACCAACCTGTACTGGTCCCGG CACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTAC CTGACCTCTAACCGGGCCACCGGATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCC GGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCGGTG TACTACTGCCAGCAGTGGTCTCCAACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAAG CTGGAAATCAAG

Cadena ligera Kappa WT de PD1 LO115	sec. con núm. de ident.: 24	CAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCTGCCACCCTGTCCCTGAGCCCTGGCGAGAGA GCCACCCTGAGCTGCTCCGCCTCCTCCAAGCACACCAACCTGTACTGGTCCCGG CACATGTACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCTAC CTGACCTCTAACCGGGGCCACCGGCATCCCTGCCAGATTCTCCGGCTCTGGCTCC GGCACCAGCTTCACCTTGACCATCTCCAGCCTGGAACCCGAGGACTTCGCGGTG TACTACTGCCAGCAGTGGTCCCTCCAACCCCTTCACCTTCGGCCAGGGCACCAG CTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT GATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTC TATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGT AACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG GGAGAGTGTTAG
Cadena pesada variable de TIGIT VAR1	sec. con núm. de ident.: 25	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCA CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCA TATCGGGGGGAGGTGAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCA TCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACCCGCTACCGCTACAT TACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
Cadena pesada de botón de TIGIT VAR1	sec. con núm. de ident.: 26	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCTATGCACT GGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCATAT GCGGGGGAGGTGAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTC CAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTG AGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGACCCGCTACCGCTACATTACTAC GGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCGTCGAC CAAAGGTCCGAGCGTGTGCCCGCTGGCACCGAGCAGCAAAAGCACCTCTGGTG GCACCGCAGCACTGGGTGTCTGGTGAAAGATTATTTTCCGGAACCGGTTACC GTTTCTTGGAATAGCGGTGCACTGACCAGCGGTGTTTATACCTTTCCGGCAGT CCTGCAGAGCAGCGGTCTGTATAGCCTGTCTAGCGTTGTTACCGTTCCGAGCA GCAGCCTGGGCACCCAGACCTATATTTGCAATGTGAATCATAAACCGAGCAAT ACCAAAGTTGATAAACGCGTTGAACCGAAAAGCGTGGACAAAACCTACACGTG CCCACCGTGCCAGCACCTGAGTTTCGAGGGGGGACCGTCACTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTG AATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCAGCAT CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTCTACA CCCTGCCCCCATGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGGTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGG GCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCTTAAGCCTGTCTCCGGGTAAATGA
Cadena ligera variable de TIGIT VAR1	sec. con núm. de ident.: 27	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCTCCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTC ACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAATATCGGAAGGAGGCCTGTAAACTGG TACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCTCATCTATAGTCAGAATCAG CGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAGTCTGGCACCTCAGCC TCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTTCTGTGCA GTTTGGGATGACATCGGCCGCGTCTGCAGTTAGGCGGAGGCACCCAGCTGACC GTCCTA

Cadena ligera Lambda modificada genéticamente de TIGIT VAR1	sec. con núm. de ident.: 28	CAGTCTGTGCTGACTCAGCCTCCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTC ACCATCTCTTGTCTGGAAGCAGCTCCAATATCGGAAGGAGGCCTGTAACTGG TACCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATAGTCAGAATCAG CGGCCCTCAGGGGTCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCCAGTCTGGCACCTCAGCC TCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGATGAGGCTGATTATTTCTGTGCA GTTTGGGATGACATCGGCCGCGTCTGCAGTTAGGCGGAGGCACCCAGCTGACC GTCTAGGTACAGCCAAGGCGGCCCTCGGTCACTCTGTTCGCCCTGCTCT GAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCCACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTAC CCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGA GTGGAGACCACACACCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGC TACCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAG GTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAAGTGTCA TGA
---	--------------------------------	---

Estudio de unión concurrente

Los estudios de unión actuales a proteínas PD-1 y TIGIT humanas recombinantes se midieron mediante interferometría de biocapa en un instrumento Octet384 (ForteBio, Fremont, CA). La proteína TIGIT humana biotinilada a 0,5 µg/ml en regulador de ensayo [PBS pH 7,2, 3 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA), 0,05 % (v/v) de Tween 20] se capturó en biosensores de estreptavidina (SA) (ForteBio, Fremont, CA) como se muestra en la Figura 8A. La proteína PD-1 humana a 5 µg/ml en regulador de ensayo se capturó en biosensores de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (ForteBio, Fremont, CA) como se muestra en la Figura 8B. Después de una etapa de lavado para eliminar cualquier proteína no unida, los biosensores cargados respectivos se sometieron a interacciones de asociación y disociación sucesivas, primero con 133 nM de AZD2936 y luego con antígenos de PD-1 humanos o TIGIT humanos a 300 nM. Las curvas de asociación y disociación se calcularon a partir de

un ajuste no lineal de los datos usando el software Octet384 v.9.0. La capacidad de AZD2936 para unir simultáneamente las proteínas PD-1 y TIGIT humanas recombinantes se determinó mediante análisis Octet. Como se muestra en las Figuras 8A y 8B, AZD2936 demostró la unión simultánea al antígeno de TIGIT humano y PD-1 humano

Ejemplo 3: Ensayos de unión celular

La unión a AZD2936 se probó frente a PD1 y TIGIT expresado en superficie celular frente a anti-PD1 monoespecífico (L0115), anti-TIGIT monoespecífico (VAR1), y un control de isotipo como se muestra en las Figuras 9A-9C. Específicamente, se realizaron ensayos de unión de equilibrio basados en células para medir la afinidad aparente de la unión de AZD2936 a los receptores de PD-1 y TIGIT humanos expresados en la superficie celular de líneas celulares modificadas genéticamente. Para este propósito, las líneas celulares Jurkat se modificaron genéticamente para expresar receptores de PD-1 y/o TIGIT humanos. Para determinar si estos subconjuntos celulares fueron relevantes para la evaluación de la unión a AZD2936, se cuantificaron las densidades de los receptores de superficie celular de PD-1 y TIGIT humanos. Como se muestra en la Tabla 5, la densidad del receptor de PD-1 en las células PD-1+TIGIT- Jurkat positivas únicas se determinó

como 11700 (SD ± 6690) receptores/célula y la densidad del receptor de TIGIT en las células PD-1-TIGIT⁺ Jurkat positivas únicas se determinó como 147000 (SD ± 91500) receptores/célula. Las densidades de los receptores de PD-1 y TIGIT en las células PD-1⁺TIGIT⁺ Jurkat dobles positivas fueron 621000 (SD ± 210000) y 149000 (SD ± 89100), que exhiben un exceso de 4,17:1 de receptor de PD-1 sobre el receptor de TIGIT.

Tabla 5: Densidad de receptor de PD-1 y TIGIT en líneas celulares Jurkat modificadas genéticamente, n = 4

Línea celular	PD-1 (receptores/ célula, media $\pm$ SD)	TIGIT (receptores/ célula, media $\pm$ SD)	PD-1/TIGIT (relación)
PD-1 ⁺ TIGIT ⁻ Jurkat	11700 ($\pm$ 6690)	ND	ND
PD-1 ⁻ TIGIT ⁺ Jurkat	ND	147000 ($\pm$ 91500)	ND
Jurkat PD-1 ⁺ TIGIT ⁺	621000 ($\pm$ 210000)	149000 ($\pm$ 89100)	4,17

ND = no determinado; PD-1 = proteína de muerte celular programada 1; TIGIT = inmunorreceptor de células T con Ig y dominios de motivos inhibidores basados en tirosina inmunorreceptores. SD = desviación estándar.

La unión de AZD2936 se evaluó junto con mAb bivalentes, y se detectó en 3 líneas celulares Jurkat modificadas genéticamente para expresar receptores de PD-1 humano y/o TIGIT humano. AZD2936 unido a células de PD-1⁻TIGIT⁺ Jurkat de una manera dependiente de la concentración y mantuvieron las propiedades de unión celular del mAb anti-TIGIT a los receptores TIGIT (Figura 9A). En comparación con

el anticuerpo anti-TIGIT bivalente, AZD2936 demostró un aumento (2,85 veces) en valores de EC_{50} de unión (Tabla 6) y aumento de la unión máxima (Figura 9A). AZD2936 unido a células de PD-1⁺TIGIT⁻ Jurkat de una manera dependiente de la concentración. En comparación con el anticuerpo anti-PD-1 bivalente para la unión en las células de PD-1⁺TIGIT⁻ Jurkat, AZD2936 demostró un aumento (4,82 veces) en valores de EC_{50} de unión (Tabla 7) y aumento de la unión máxima (Figura 9B). Estos resultados demostraron que la unión monovalente es suficiente para el acoplamiento de TIGIT o PD-1 en las células Jurkat.

Tabla 6: AZD2936 y actividad de unión de Anti-TIGIT en células de TIGIT⁺ Jurkat

	Experimento núm. 1	Experimento núm. 2	EC_{50} media (nM)	Cambio de veces vs. anti-TIGIT
	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)		
AZD2936	0,303	0,375	0,339	2,85
Anti-TIGIT	0,092	0,147	0,119	1,00

Tabla 7: AZD2936 y actividad de unión anti-PD-1 en células de PD⁺ Jurkat

	Experimento núm. 1	Experimento núm. 2	EC_{50} media (nM)	Cambio de veces vs. anti-PD-1
	EC_{50} (nM)	EC_{50} (nM)		

AZD2936	0,944	5,490	3,217	4,82
Anti-PD-1	0,349	0,985	0,667	1,00

Tabla 8: Actividad de unión de AZD2936 en células de PD-1⁺TIGIT⁻, PD-1⁻TIGIT⁺ y PD-1⁺TIGIT⁺ Jurkat

	Experimento núm. 1	Experimento núm. 2	EC ₅₀ media (nM)
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	
PD-1 ⁺ TIGIT ⁺ Jurkat	0,495	0,769	0,632
PD-1 ⁻ TIGIT ⁺ Jurkat	0,282	0,346	0,314
PD-1 ⁺ TIGIT ⁻ Jurkat	0,584	1,01	0,797

Las propiedades de unión celular de AZD2936 a las líneas celulares Jurkat que expresan PD-1 (PD-1⁺TIGIT⁻) o TIGIT (PD-1⁻TIGIT⁺) o ambos receptores (PD-1⁺TIGIT⁺) se determinaron mediante un ensayo de unión por citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 9C, AZD2936 se unió a los tres tipos de células Jurkat con propiedades de unión celular similares. Para evaluar la diferencia en la afinidad de unión a AZD2936 entre las tres líneas celulares, se determinaron valores de EC₅₀ (Tabla 8). La media de EC₅₀ de AZD2936 a la línea celular de expresión única PD-1 fue 0,797 nM. La media de EC₅₀ de AZD2936 a la línea celular de TIGIT⁺PD-1⁺ de doble expresión fue 0,632 nM. La unión a la línea celular modificada genéticamente para expresar

receptores de solo TIGIT produjo la media del valor de EC_{50} más bajo a 0,314 nM.

Ensayos de cocultivo de dos células reporteras de NFAT-luciferasa

AZD2936 se probó contra anti-PD1 monoespecífico (LO115), anti-TIGIT monoespecífico (VAR1) y un control de isotipo como se muestra en las Figuras 10A-10C. Se mostró que AZD2936 era activo y tiene una mayor actividad de bloqueo de ligando tanto para PD-1 como para TIGIT en comparación con los anticuerpos monoespecíficos. Específicamente, para evaluar la capacidad de las interacciones de AZD2936 para bloquear las interacciones PD-1/PD-L1 y/o TIGIT/CD155, se utilizaron ensayos de bioactividad de cocultivo de dos células usando células CHO-K1 modificadas genéticamente para expresar la scFv anti-CD3 de OKT3, PD-L1 y CD155 y células T reporteras de NFAT luciferasa Jurkat modificadas genéticamente para expresar PD-1 humano, TIGIT humano o ambos antígenos. En el ensayo, la actividad de luciferasa bajo el control de los elementos de respuesta de NFAT se midió en respuesta a la estimulación por OKT3. La señalización de NFAT se produce corriente abajo de la señalización de TCR, y se ha informado que se correlaciona con otras medidas de activación de células T, como la proliferación y la liberación de citocinas. El bloqueo completo de las

interacciones PD-1/PD-L1 y/o TIGIT/CD155 facilitó el agonismo máximo de TCR y la posterior actividad de luciferasa.

La actividad de AZD2936 para bloquear las interacciones PD-1/PD-L1 se probó en el ensayo de cocultivo de dos células con células CHO-K1 OKT3 PD-L1 CD155 y células reporteras de NFAT-luciferasa de células T Jurkat de PD-1⁺TIGIT⁻. AZD2936 mostró una actividad dependiente de la concentración en dos experimentos duplicados con una EC50 media de 4,26 nM (EC50 de 4,70 y 3,83 nM del Experimento núm. 1 y núm. 2, respectivamente) (Figura 10A y Tabla 9). En el mismo ensayo, la EC50 media de anti-PD-1 fue de 3,03 nM (EC50 de 1,93 y 4,14 nM del Experimento núm. 1 y núm. 2, respectivamente). Ni el anticuerpo anti-TIGIT ni el anticuerpo de control de isotipo mostraron actividad en este ensayo.

Se probó la actividad de AZD2936 para bloquear las interacciones TIGIT/CD155. En este ensayo, las células CD155 aAPC/CHO-K1 se cocultivaron con células reporteras de NFAT-luciferasa DE PD-1⁻TIGIT⁺ Jurkat y las actividades de luciferasa indujeron después del tratamiento de AZD2936, mAb anti-TIGIT y un mAb de control de isotipo se compararon. En este ensayo, AZD2936 mostró una mayor actividad sobre el anticuerpo de control de isotipo con una EC50 media de 15,3 nM de dos experimentos (EC50 de 17,0 nM y 13,7 nM en el

Experimento núm. 1 y núm. 2, respectivamente) (Figura 10B y Tabla 10). En el mismo experimento, el tratamiento de anti TIGIT dio como resultado una EC₅₀ media de 2,22 nM de dos experimentos (EC₅₀ de 1,59 y 2,85 nM en el Experimento núm. 1 y núm. 2, respectivamente).

La actividad de AZD2936 para bloquear las interacciones de PD-1/PD-L1 y TIGIT/CD155 en un ensayo se evaluó con células CHO-K1 OKT3 PD-L1 CD155 y células reporteras de NFAT-luciferasa de células T de PD-1⁺TIGIT⁺ Jurkat. AZD2936 mostró actividad en dos experimentos duplicados con una EC₅₀ media de 5,82 nM (EC₅₀ de 5,57 y 6,07 nM en dos experimentos separados) (Figura 10C y Tabla 11).

Tabla 9: Bioactividad de AZD2936 y anticuerpo Anti-PD-1 en ensayos de cocultivo de dos células reporteras de NFAT-Luciferasa de células T Jurkat de PD-1⁺TIGIT⁻ humanas

	Experimento núm. 1	Experimento núm. 2	EC ₅₀ media (nM)	Cambio de veces de EC ₅₀ media vs. anti- PD-1
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)		
AZD2936	4,70	3,83	4,26	1,40
Anti-PD-1	1,93	4,14	3,03	1,00

EC₅₀ = concentración efectiva máxima media; NFAT = factor nuclear de células T activadas; PD-1 = proteína de muerte celular programada 1; TIGIT = inmunorreceptor de células T con Ig y dominios de motivos inhibidores basados en tirosina inmunorreceptores. EC₅₀ se derivó de los valores medios tomados de 3 réplicas.

Tabla 10: Bioactividad de AZD2936 y anticuerpo Anti-PD-1 en ensayos de cocultivo de dos células reporteras de NFAT-Luciferasa de células T Jurkat de PD-1⁻TIGIT⁺ humanas

	Experimento núm. 1	Experimento núm. 2	EC ₅₀ media (nM)	Cambio de veces de EC ₅₀ media vs. anti-TIGIT
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)		
AZD2936	17,0	13,7	15,3	6,89
Anti-TIGIT	1,59	2,85	2,22	1,00

EC₅₀ = concentración efectiva máxima media; NFAT = factor nuclear de células T activadas; PD-1 = proteína de muerte celular programada 1; TIGIT = inmunorreceptor de células T con Ig y dominios de motivos inhibidores basados en tirosina inmunorreceptores.

EC₅₀ se derivó de los valores medios tomados de 3 réplicas.

Tabla 11: Bioactividad de AZD2936 y la combinación de anticuerpos Anti-PD-1 y Anti-TIGIT en ensayos de cocultivo de dos células reporteras de NFAT-Luciferasa de células T Jurkat de PD-1⁺TIGIT⁺ humanas

	Experimento núm. 1	Experimento núm. 2	EC ₅₀ media (nM)	Cambio de veces de EC ₅₀ media vs. combinación de anti-TIGIT y anti- PD-1
	EC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)		
AZD2936	5,57	6,07	5,82	0,93
Combinación de anticuerpos anti-TIGIT y anti-PD-1	6,09	6,45	6,27	1,00

EC₅₀ = concentración efectiva máxima media; NFAT = factor nuclear de células T activadas; PD-1 = proteína de muerte celular programada 1; TIGIT = inmunorreceptor de células T con Ig y dominios de motivos inhibidores basados en tirosina inmunorreceptores. La EC50 se derivó de los valores medios tomados de 3 réplicas

Ejemplo 4: Ensayo de destrucción de células tumorales OE21

La capacidad de AZD2936 para destruir células tumorales OE21 se evaluó en un sistema de ensayo in vitro. Las abreviaturas usadas en esta sección son: ANOVA = análisis de variancia; CMV = virus citomegalovirus; EBV = virus de Epstein Barr; ELISA = ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; IFN- γ = interferón- γ ; ns = no significativo; OE21-VP = línea celular de carcinoma de células escamosas esofágico caucásico humano modificado genéticamente para expresar péptidos virales (VP); PBMC = células mononucleares de sangre periférica; PD-1 = proteína de muerte celular programada 1; TIGIT = inmunorreceptor de células T con Ig y dominios de motivos inhibidores basados en tirosina inmunorreceptores.

Sistema de cocultivo de células tumorales y células T específicas de antígeno compatible con HLA y Generación de líneas de células tumorales OE21 que expresan de manera estable antígenos peptídicos virales

Se generó un modelo de cocultivo de células tumorales y célula T específicas de antígeno compatible con HLA para evaluar la actividad in vitro y la potencia de AZD2936 en la destrucción de células tumorales mediada por células T. La línea celular de carcinoma de células escamosas

esofágico humano positivo para HLA-A*02:01, OE21, se modificó genéticamente para expresar seis péptidos de antígeno viral conocidos para unirse a HLA-A*02:01 (OE21-VP). Los seis péptidos virales usados fueron el péptido de LMP2 356-364 de virus de Epstein Barr humano (secuencia de aminoácidos de FLYALALLL; sec. con núm. de ident.: 29), LMP2 426-434 (secuencia de aminoácidos de CLGGLLTMV; sec. con núm. de ident.: 30), BMLF1 280-288 (secuencia de aminoácidos GLCTLVAML; sec. con núm. de ident.: 31); Influenza M1 58-66 (secuencia de aminoácidos GILGFVFTL; sec. con núm. de ident.: 32), influenza A PA46-54 (secuencia de aminoácidos FMYSDFHFI; sec. con núm. de ident.: 33); y citomegalovirus pp65 495-503 (secuencia de aminoácidos NLVPMVATV; sec. con núm. de ident.: 34). El transgén que codifica los péptidos virales y los casetes reporteros de GFP impulsados a partir del promotor de ubiquitina-C humano constitutivo se generaron por síntesis génica (GeneArt™, Pleasanton, CA). Se insertaron transgenes en vectores de expresión lentiviral usando técnicas estándar de biología molecular. Los constructos transgénicos verificados por secuencia se usaron luego para generar partículas lentivirales a partir de una línea celular HEK293FT (Life Technologies, Grand Island, NY) mediante el Kit de envasado de lentivector VIH pPACKH1 (Systems Bioscience, Palo Alto, CA) según las instrucciones del

fabricante. Las líneas clonales que sobreexpresan el transgén de células únicas se seleccionaron mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para aislar las células GFP+, y las líneas celulares que exhiben perfiles de expresión de transgén uniformes se almacenaron y progresaron para una caracterización adicional.

Expansión de células T específicas de péptido GLCTLVAML (sec. con núm. de ident.: 31) y NLVPMVATV (sec. con núm. de ident.: 34) de donantes sanos positivos para HLA-A*02:01

Se cribaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes saludables positivos para HLA-A*02:01 para determinar la reactividad al péptido EBV BMLF1 280-288 (GLCTLVAML) y el péptido CMV pp65 495-503 (NLVPMVATV) mediante citometría de flujo para marcadores de activación. Brevemente, las PBMC se trataron con 1 µg/ml de péptido y 55 unidades internacionales (IU)/ml de IL-2 durante siete días, posteriormente se tiñeron con anticuerpos de CD3, CD8, CD25 y TIM3 conjugados con fluorescencia y se evaluaron mediante citometría de flujo para la unión. Los donantes se identificaron como reactivos de EBV o CMV si >10 % de células T de CD8+ CD3+ se teñían positivamente tanto para CD25 como para TIM-3.

Las PBMC reactivas al péptido EBV BMLF1 280-288 o el péptido CMV pp65 495-503 se aislaron de sangre de donante sano (positivo para HLA A*02:01) usando un separador de células automatizado RoboSep™-S (StemCell Technologies, Cambridge, MA) en combinación con un kit de aislamiento de PBMC humanas directas EasySep™ (StemCell Technologies), según las instrucciones del fabricante. Como se muestra en la Figura 1B, luego se resuspendieron PBMC aisladas a $1,5 \times 10^7$ células/ml en una mezcla 1:1 de medios de cultivo RPMI completos que contienen medios RPMI-1640™ (Gibco) y AIM-V™ (Gibco), suero humano HI al 5 % (Sigma Aldrich), 100 U/ml de penicilina (Gibco) y 100 µg/ml de estreptomycin (Gibco), en presencia de 1 µg/ml de péptido (MBL International Corporation) y 55 UI/ml de IL-2 humana recombinante (PeproTech) durante media hora antes del cultivo posterior en una placa de pocillos G-Rex6® (Wilson Wolf Corporation) a 40 ml de medio de IL-2 por pocillo durante 7 días a 37 °C, 5 % de CO2 antes del análisis.

Análisis de células T de CD8+ específicas de péptido GLCTLVAML (sec. con núm. de ident.: 31) y NLVPMVATV (sec. con núm. de ident.: 34)

Las PBMC expandidas se analizaron mediante citometría de flujo usando un instrumento de LSR II® (BD Biosciences) para cuantificar las células T de CD8+ específicas

de antígeno. Después de la expansión, las PBMC se lavaron con regulador FACS (PBS pH 7,2 (Gibco), 2 % de FBS (Gibco) y 2 mM de EDTA (Gibco)) y se incubaron con HLA-A*02:01/GLCTLVAML o HLA-A*02:01/NLVPMVATV etiquetados de manera fluorescente (ImmuDex™) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las PBMC se tiñeron conjuntamente con anti-CD3 marcado con fluorescencia (clon HIT3a, Biolegend), anti-CD8 (clon HIT8A, Biolegend), anti-PD-1 (clon EH12.2H7, Biolegend) y anti-TIGIT (clon A15153G, Biolegend™) para distinguir diferentes poblaciones celulares. Después de lavar dos veces con regulador FACS, se analizaron las células para detectar anticuerpos unidos mediante citometría de flujo. La cantidad de anticuerpos unidos a la superficie celular se detectó usando el software FACSDiva™ (BD Biosciences). El análisis de datos se realizó usando el software FlowJo™ (BD Biosciences). El porcentaje de células T de CD8+ específicas para antígeno (reguladas basadas en singlete, sin residuos, CD3+, CD8+ y positivas para GLCTLVAML o dextrámero NLVPMVATV) después de la expansión se determinó usando la fórmula:

$$\text{Número Total de células T de CD8+ específicas de antígeno} = A \times (B/100);$$

Donde A es la cantidad total de células recolectadas, y B es el % de células T de Singlete, menos residuos, CD3+ CD8+ que son positivas para dextrámero.

Ensayo de destrucción de células T

Se desarrolló un sistema de ensayo de cocultivo para medir la capacidad de AZD2936 para modificar la destrucción de células T de CD8+ específicas del antígeno de células tumorales. La lisis de células tumorales se evaluó usando la plataforma Agilent xCELLigence RTCA®, por lo que se usó la pérdida de impedancia celular como sustituto para la muerte de células tumorales (Oberg et al., Front Immunol. 2014;5:643). Brevemente, las células OE21-VP se recolectaron de frascos de cultivo celular usando tripsina, se lavaron una vez con medio de cultivo RPMI™ completo, se resuspendieron en medio RPMI™ completo, y se añadieron a cada pocillo de los 96 pocillos de RTCA E-Plates® a 10.000 células por pocillo. Las células tumorales se cultivaron en E-Plates® durante 24 horas a 37 °C en 5 % de CO2 según las instrucciones del fabricante. Se añadieron artículos de control y de prueba a los pocillos inmediatamente antes de añadir las células T de CD8+ específicas de péptido en relaciones optimizadas de efector a diana (E:T), que se predeterminaron para cada población de células T CD8+ de

donante usada en este estudio (con una relación de 2:1 de células T efectoras a diana de tumor). La muerte de células tumorales y el porcentaje de citólisis se monitorearon en un rango de 3-8 días después de la adición de células T (dependiente del donante), y los valores se calcularon usando el software RTCA Pro® de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis de valores de EC50

La pérdida de impedancia celular se calculó en el software RTCA PRO® (Agilent), que midió la impedancia celular en tiempo real como un marcador de la destrucción de células tumorales. El área bajo la curva para la citólisis en tiempo real (Citólisis*Horas) se determinó y se graficó para calcular los valores de EC50 en el software Prism® (GraphPad Software, San Diego, CA) para los cocultivos de artículo de control y de prueba a concentraciones que varían de 0,0001 nM a 10 nM en comparación con los cocultivos de células T sin la inclusión de artículo de control y de prueba solos (efecto inicial). La impedancia se midió continuamente cada 10 minutos hasta la finalización del estudio, lo que ocurrió 6 días después de la adición de células T.

Medición de las concentraciones de IFN- γ en sobrenadantes de cocultivo

Para evaluar la cantidad de IFN- γ detectada dentro de los sobrenadantes de cocultivos que contienen células tumorales OE21-VP y células T de CD8+ reactivas tumorales, se establecieron cocultivos paralelos separados en placas de 96 pocillos Nunc (Sigma Aldrich) junto con placas xCELLigence®RTCA E-Plates®. Para la evaluación de la liberación de IFN- γ , los sobrenadantes se recolectaron de los cocultivos en las placas Nunc de 96 pocillos veinticuatro horas después. La comparación de los niveles de IFN- γ se evaluó a la concentración de 200 pM de artículos de control y de prueba. El IFN- γ se midió usando ELISA de múltiples puntos de Mesoscale Discovery para IFN- γ humano según las instrucciones del fabricante.

Métodos estadísticos

Para la citólisis y la liberación de IFN- γ , el análisis estadístico se realizó en Prism®, versión 8.0.1 para Windows® (GraphPad Software, San Diego, CA). Se realizó ANOVA de una vía, asumiendo esfericidad (igual variabilidad de las diferencias), pruebas de comparación múltiple de Tukey. Los valores de EC50 se modelaron con una curva de ajuste no lineal usando dosis logarítmica frente a respuesta normalizada. Para

la evaluación de las diferencias en los valores de EC50 entre los grupos de tratamiento con AZD2936 y anti-PD-1, los valores de EC50 se transformaron logarítmicamente, los medios de grupos se compararon usando una prueba t de Student pareada de dos lados y se evaluaron asumiendo variaciones desiguales para los dos grupos. Los valores p se presentan en cada figura como p no significativo (ns) $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Se recolectaron células T de CD8+ positivas y se agruparon de cinco donantes humanos sanos. Las PBMC humanas primarias expandidas con el péptido EBV o CMV se cocultivaron con artículos de control y de prueba (0,2 nM de control de isotipo, 0,2 nM de anti-PD-1, 0,2 nM de anti-TIGIT, 0,1 nM de anti-TIGIT + 0,1 nM de anti-PD-1 o 0,2 nM de AZD2936) y células tumorales OE21-VP.

La Figura 11A muestra que AZD2936 tuvo una mayor actividad sobre anti-PD-1 en este ensayo de destrucción celular in vitro mediado por células T de CD8. Como se muestra en la Figura 11A, AZD2936 muestra una mejora significativa en la destrucción de células tumorales OE21-VP en comparación con la administración del anticuerpo anti-PD1 solo.

Después del reconocimiento del antígeno, las células T de CD8+ secretan IFN- γ , una citocina que promueve además la inmunidad antitumoral y los efectos citotóxicos de

células T de CD8⁺ (Bhat et al Cell Death Dis., 2017 Jun 1;8(6):e2836). Por lo tanto, la liberación de IFN- γ se evaluó después del cultivo de células T de CD8⁺ específicas de péptidos con células OE21-VP.

Las PBMC humanas primarias expandidas con el péptido EBV o CMV se cocultivaron con artículos de control y de prueba (0,2 nM de control de isotipo, 0,2 nM de anti-PD-1, 0,2 nM de anti-TIGIT, 0,1 nM de anti-TIGIT + 0,1 nM de anti-PD-1 o 0,2 nM de AZD2936) y células tumorales OE21-VP. La concentración de IFN- γ del ensayo de cultivo de células T y de células tumorales se midió a partir de sobrenadantes recolectados veinticuatro horas después de la adición de células T. Los resultados se muestran en la Figura 11B. La concentración de IFN- γ se determinó usando EELISA de múltiples puntos de Mesoscale Discovery para IFN- γ humano. Se informa el cambio de veces de todos los valores en comparación con un promedio para el control de isotipo. Los datos representan a 4 donantes distintos. La significación estadística se calculó usando ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey. Las líneas horizontales representan valores medios aritméticos dentro del grupo. ***, $p < 0,001$, ****, $p < 0,0001$.

Como se muestra en la Figura 11B, en cocultivos de células T aislados y expandidos a partir de las PBMC de cuatro

donantes sanos, AZD2936 indujo una cantidad de IFN- γ aumentada estadísticamente significativamente en el sobrenadante de cocultivos con células tumorales en comparación con el control de isotipo y anti-PD-1.

El ensayo de destrucción celular in vitro también se usó para determinar la diferencia en la citotoxicidad entre el anticuerpo AZD2936 y anti-PD-1. Una titulación de concentración de anticuerpos de 10 nM a 0,1 pM mostró que la EC50 media aritmética para AZD2936 fue $21,9 \pm 3,4$ pM (SD) y $163 \pm 70,6$ pM (SD) para anti PD 1 (Figura 11D), lo que produjo un aumento de 6,44 veces la potencia de AZD2936 en comparación con anti-PD-1 (Figura 11C).

Ejemplo 5: Modelos de ratón de tumor de xenoinjerto humano

OE21 y PC9-MART1

El modelo de tumor OE21 y el modelo de tumor PC9-MART1 (Figuras 12A-12D, y 13A-13D, respectivamente) se usaron para investigar la capacidad del AZD2936 para inhibir el crecimiento tumoral. La actividad de AZD2936 se investigó en modelos de ratón con xenoinjerto de tumor humano mediante el uso de ratones gamma nulos (NSG) de receptor IL-2 diabéticos no obesos inmunodeficientes/inmunodeficiencia combinada severa (NOD-scid). Los animales se inocularon por vía subcutánea con líneas celulares cancerosas humanas modificadas genéticamente

para expresar antígenos peptídicos presentados por HLA-A*2:01. Un modelo utilizó OE21-VP, una línea celular de carcinoma esofágico modificadas genéticamente para expresar péptidos virales. Otro modelo utilizó PC9-MART1, una línea celular de adenocarcinoma de pulmón modificadas genéticamente para expresar un antígeno de melanoma 1.

Las líneas celulares tumorales se inyectaron en el flanco de ratones mediante inyección subcutánea (SC) y después de que los tumores crecieron en volumen a alrededor de 200 mm³, cada ratón recibió una inyección IV de células T humanas específicas para antígenos expresados por las líneas de células tumorales. Los animales recibieron la primera dosis de los artículos de prueba y control dentro de las 24 horas posteriores a la aleatorización, y posteriormente se administraron tres dosis adicionales de los artículos de prueba y control.

La administración intraperitoneal de AZD2936 a los animales inhibió significativamente el crecimiento de tumores en comparación con la actividad de su anticuerpo anti-PD-1 bivalente parental (Anti PD-1), combinación de Anti-TIGIT y Anti-PD-1 y un anticuerpo de control de isotipo bivalente dirigido a un antígeno irrelevante, R347 (control de isotipo) como se muestra en las Figuras 12A-12D y 13A-13D. El tratamiento con AZD2936 inhibió el crecimiento tumoral durante

toda la duración de los estudios y en dos modelos de ratón de xenoinjerto que utilizan células T con diferentes especificidades de antígeno. La actividad antitumoral de AZD2936 ocurrió mediante el uso de células T específicas de tumor derivadas de dos donantes sanos independientes cada uno para los modelos OE21-VP y PC9-MART-1.

Ejemplo 6: Caracterización de la función efectora para AZD2936

Los anticuerpos terapéuticos se basan en dos tipos de funcionalidades para ejercer eficacia clínica: unión específica de la diana por el dominio Fab y funciones efectoras mediada por el sistema inmunitario mediante la interacción del dominio Fc. Cuando los anticuerpos IgG se unen a antígenos de superficie celular a través de sus dominios Fab, la porción Fc de los anticuerpos puede unirse al componente 1q (C1q) del complemento, el primer miembro de la vía del complemento clásico activada por anticuerpos o puede acoplarse con receptores Fc gamma (FcγR) expresados en células destructoras naturales y otras células mieloides.

La interacción con C1q inicia la cascada del complemento, lo que da como resultado la formación de complejos de ataque de membrana que destruyen la célula diana al interrumpir su membrana celular, un proceso descrito como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La interacción

del dominio Fc de un anticuerpo con FcγRIIIa induce la reticulación de los FcγR, lo que desencadena la liberación de gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas, lo que conduce a la muerte de la célula diana unida por el dominio de unión al antígeno del anticuerpo, un proceso denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (Nimmerjahn y Ravetch, Nature Reviews Immunology, 8:34 -47, 2008). AZD2936 es un anticuerpo monoclonal IgG1 monovalente, biespecífico, humanizado, modificado genéticamente para tener mutaciones dentro de su dominio Fc para disminuir la funcionalidad efectora mediada por Fc. Estas mutaciones de Fc son una mutación triple L234F/L235E/P331S. El potencial de AZD2936 para iniciar la actividad de CDC y ADCC se evaluó usando una línea celular Jurkat modificada genéticamente para expresar TIGIT y PD-1.

El porcentaje de células Jurkat que expresan PD-1 y TIGIT (Figura 14A) o células Daudi (Figura 14B) vivas después de la incubación con AZD2936, control de isotipo IgG1-TM, rituximab o control de isotipo IgG1, junto con complemento que contiene suero humano o suero humano inactivado por calor se estimó mediante la adición de Cell-Titer Glo®. Cell-Titer Glo® produce una señal luminiscente proporcional al número de células vivas en cada pocillo. Estos resultados muestran que el AZD2936 no desencadenó CDC

en las células de PD-1⁺TIGIT⁺ Jurkat (Figura 14A). Por el contrario, el rituximab, un anticuerpo anti-CD20 conocido que tiene actividad de CDC, demostró efectos dependientes de la concentración en CD20 que expresan células Daudi en presencia del mismo suero humano usado en el ensayo con AZD2936, pero no en presencia de un control de suero inactivado por calor (Figura 14B). El control de isotipo IgG1 no tuvo ningún efecto sobre el porcentaje de células viables para cualquier tipo de célula. Ninguna muestra usando suero inactivado por calor dio como resultado una disminución dependiente de la concentración en la viabilidad, lo que confirma que la muerte celular observada estaba mediada por CDC.

Se evaluó la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) usando PBMC de donantes sanos como las células efectoras y una línea celular Jurkat que expresa PD-1 y TIGIT como la célula diana. En este ensayo, AZD2936 demostró una actividad similar como las muestras de control de isotipo, y produjo una reducción estadísticamente significativa en la actividad de ADCC en comparación con el control positivo, rituximab usando células Daudi que expresan CD20 como la célula diana, en todas las concentraciones emparejadas por encima de 0,061 ng/ml (Figura 15). Los resultados de este estudio

muestran que AZD2936 no desencadenó ADCC o CDC contra una línea celular Jurkat que expresa PD-1 y TIGIT.